

УДК 575.1:633.13

ГЕНОМНАЯ КОНСТИТУЦИЯ АВТОТЕТРАПЛОИДНОГО ОВСА *Avena macrostachya*, ВЫЯВЛЕННАЯ ПУТЕМ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ITS1 И ITS2: К ВОПРОСУ ОБ ЭВОЛЮЦИИ КАРИОТИПОВ ОВСОВ И ОВСЮГОВ НА РАННИХ ЭТАПАХ ДИВЕРГЕНЦИИ ВИДОВ РОДА *Avena*

© 2005 г. А. В. Родионов¹, Н. Б. Тюпа¹, Е. С. Ким¹, Э. М. Мачс¹, И. Г. Лоскутов²¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург 197376; e-mail: biocyt@rednet.ru² Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург 190000

Поступила в редакцию 30.04.2004 г.

Для того чтобы исследовать геномный состав кариотипа *Avena macrostachya*, секвенировали ITS1, ITS2 и гены 5.8S ядерных рРНК *A. macrostachya*, трех видов овсов с кариотипом AsAs (*A. wiestii*, *A. hirtula*, *A. atlantica*), а также *A. longiglumis* (AlAl), *A. canariensis* (AcAc), *A. ventricosa* (CvCv), *A. pilosa* и *A. clauda* (CpCp). Показано, что все исследованные виды рода *Avena* представляют из себя монофилетическую группу (бутстрэп-индекс = 98), в составе которой выделяются две ветви – виды с геномами типа А и виды с геномами типа С (бутстрэп-индексы = 100). Объект нашего исследования *A. macrostachya* сохранил “симметричный” кариотип (т.е. кариотип с метацентрическими хромосомами), характерный, по-видимому, для общего предка *Avena*, однако относится к филогенетической ветви овсов с геномом С (кариотип с субметацентричными и субакроцентричными хромосомами). Мы предлагаем классифицировать геном *A. macrostachya* как особую форму С-генома – См-геном. Среди исследованных видов из других родов наиболее близок к *Avena* по структуре ITS1 и ITS2 *Arrhenatherum elatius*. Филогенетические отношения между *Avena* и *Helictotrichon* остаются интригующе неясными. Последовательность HPR389153 из генома *H. pratense* наиболее близка к ITS1 видов *Avena* с геномом А (*p*-расстояние = 0.0237), в то время как различия этой последовательности с последовательностью ITS1 *A. macrostachya* достигают 0.1221. С другой стороны, последовательность HAD389117 из генома *H. adsurgens* близка к ITS1 видов *Avena* с геномом С (*p*-расстояние = 0.0189), различия же ее от ITS1 видов с геномом А достигают 0.1221. Возможно, появление высокополиплоидных ($2n = 12x - 21x$) видов *H. pratense* и *H. adsurgens* было связано с межвидовой гибридизацией в которой принимали участие средиземноморские овсы с геномами А и С. Предложена гипотеза о путях эволюции хромосом *Avena* на ранних этапах дивергенции видов этого рода.

Avena macrostachya Bal. ex Coss. et Dur. – эндемик Атласских гор (северо-восток Алжира) [1, 2], привлекает внимание селекционеров и генетиков устойчивостью к вирусу желтой карликовости (BYDV), к стеблевой и корончатой ржавчине, к красно-бурой пятнистости, к повреждению тлями, шведской мухой и отличается повышенной зимостойкостью [2–6]. Среди всех видов овсов и овсюгов (род *Avena*) *A. macrostachya* – единственный многолетник и перекрестноопылитель [2–12]. Эти признаки, которые для *Avenae* принято считать архаичными [3, 8–13], характерны для представителей близкого к *Avena* рода *Helictotrichon* (овсец) [12, 13]. Кариотип *A. macrostachya* также напоминает кариотип некоторых овсецов [12]. На этих и иных основаниях *A. macrostachya* иногда относят к роду *Helictotrichon* под названием *Helictotrichon macrostachyum* (Bal. ex Coss. et Dur.) Henrard [2], однако Баум, проведя кладистический анализ с учетом более 100 вариаций 29 морфологических признаков представите-

лей рода *Avena* и близких к нему родов, пришел к заключению, что *A. macrostachya* является архаичным представителем рода *Avena* [8, 9]. В пределах рода *Avena* *A. macrostachya* предложено выделять в особую секцию *Avenotrichon* (Holub) Baum или *Avenastrum* Koch, помещая эту секцию в основании филогенетического дерева *Avena* [6, 9].

Геномная или правильнее, поскольку речь идет о полиплоиде, субгеномная (см. [14]) конституция *A. macrostachya* неясна. По морфологии хромосом у представителей рода *Avena* принято выделять четыре типа генома – А, В, С и D (обзоры [6, 11, 15–17]). Типы геномов А и С известны в диплоидном состоянии у дикорастущих видов овса и, кроме того, они входят в состав кариотипов гексаплоидов (AACDD). Тип генома В известен только в составе кариотипов трех видов тетраплоидов – *A. barbata*, *A. abyssinica* и *A. vaviloviana* (кариотип AABB) и очень близок к типу генома А [18, 19]. Геномы типа D выявлены только в соста-

Таблица 1. Список исследованных видов, их геномный состав и происхождение

№ п/п	Вид	Геномный состав	Число (2n) хромосом в кариотипе	Номер образца по каталогу ВИР и место первоначального сбора
1	<i>Avena canariensis</i> Baum	AcAc	14	К-1916, Испания
2	<i>A. longiglumis</i> Dur.	AlAl	14	К-1811, Марокко
3	<i>A. atlantica</i> Baum et Fedak	AsAs	14	К-1894, Марокко
4	<i>A. hirtula</i> Lag.	AsAs	14	К-2, Израиль; К-2034, Тунис
5	<i>A. wiestii</i> Steud.	AsAs	14	К-95, Израиль
6	<i>A. clauda</i> Dur.	CpCp	14	К-267, Азербайджан
7	<i>A. pilosa</i> M.B. (syn. <i>eriantha</i>)	CpCp	14	К-210, Азербайджан
8	<i>A. ventricosa</i> Bul.	CvCv	14	К-1909, Кипр
9	<i>A. macrostachya</i> Bal. ex Coss. et Dur.	?	28	К-1856, Алжир
10	<i>A. sativa</i> L.	AACCDD	42	К-11840, Германия (сорт Borrus)
11	<i>A. sterilis</i> L.	AACCDD	42	К-171, США
12	<i>Agrostis capillaris</i> L.		28	Ламин-Суо, Россия (Ленинградская обл.)
13	<i>Colpodium versicolor</i> (Stev.) Schmalh.		4	Теберда, Россия
14	<i>Triticum aestivum</i> L.		42	Сорт Банатка*

* Любезно предоставлен нам П.П. Стрельченко и О.П. Митрофановой.

ве кариотипов гексаплоидов и, судя по результатам GISH, очень близки А-геномам, но отличаются от С-геномов [16, 20]. С одной стороны, судя по тому, что все хромосомы *A. macrostachya* – мета- и субметацентрики, это автотетраплоид с геномом типа А [6, 17], однако рисунок С-исчерченности его хромосом совершенно не похож на С-окрашивание хромосом из А-геномов (см. [21, 22]).

При сравнительном изучении хромосом *Avena* с помощью GISH-гибридизации было показано, что субгеномы *A. macrostachya* ближе к геномам диплоидного вида *A. pilosa* (= *A. eriantha* Dur.) с геномной формулой CpCp, чем к *A. strigosa* с геномной формулой AsAs [16].

Для того чтобы исследовать геномный состав кариотипа *A. macrostachya* и определить положение этого вида на филогенетическом древе относительно диплоидных представителей рода *Avena* с геномами типа А и С, мы секвенировали последовательности ДНК внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, а также генов 5.8S ядерных рРНК *A. macrostachya*, восемь диплоидных и двух гексаплоидных вида рода *Avena* и сравнили их с имеющимися в базе данных NCBI последовательностями ITS1 и ITS2 исследованных в этом отношении представителей триб овсовые (Aveneae) и мятликовые (Poeae).

Среди исследованных нами видов представлены геномы *Avena* типа А, в частности геномы AsAs (*A. wiestii*, *A. hirtula*, *A. atlantica*), AlAl (*A. longiglumis*), AcAc (*A. canariensis*), и типа С (геномы CvCv – *A. ventricosa* и CpCp – *A. pilosa* и *A. clauda*). Выбор участка для секвенирования определялся

тем, что ITS-последовательности эволюционно изменчивы и потому информативны в геносистематических исследованиях как на межвидовом уровне [23–27], так и при анализе взаимоотношений таксонов на уровне родов, семейств и таксономических единиц более высокого порядка [28, 29]. Между тем, они секвенированы только у *A. longiglumis* (кариотип AlAl) [30], *A. sativa* (AACCDD) [26] и частично (ITS1, 5.8S рДНК и фрагмент ITS2) у *A. barbata* (AABB) [31].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования были амплифицированы и секвенированы последовательности из ядерного генома 11 видов *Avena*, одного вида *Agrostis*, одного вида *Colpodium*, одного вида *Triticum* (внешняя группа). Список исследованных образцов приведен в табл. 1.

Выделение геномной ДНК из листьев производилось по методу [32] с модификациями. Листья после высушивания (37°C) перетирали в ступке с Al₂O₃, после чего 0.5 мл полученной смеси помещали в микроцентрифужную пробирку, добавляли 500 мкл буфера TES (100 мМ трис-НСl, рН 8.0; 10 мМ ЭДТА; 2% SDS) и 50 мкл β-меркаптоэтанола, осторожно перемешивали и инкубировали 60 мин при 60°C, периодически помешивая. Затем добавляли в каждую пробирку 140 мкл 5М NaCl, 70 мкл 10%-ного СТАВ-буфера (10% СТАВ; 50 мМ трис-НСl, рН 8.0; 0.7 мМ EDTA), перемешивали и инкубировали 10 мин при 65°C. Добавляли в полученную смесь равный объем смеси

изоамилового спирта с хлороформом (1 : 24) и, постоянно перемешивая, инкубировали 60 мин при 22°C. Затем центрифугировали 10 мин на центрифуге “Eppendorf” (10000 об/мин), после чего отбিরали фазу, содержащую ДНК, в отдельную пробирку. ДНК в отобранной фракции преципитировали 0.1 объема 3М ацетата Na (pH 5.5), 1 объемом холодного (-20°C) изопропанола и инкубировали в течение 2–24 ч при -20°C, после чего ДНК осаждали на дно пробирки центрифугированием в течение 10 мин (10000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ДНК высушивали. Образец ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды или ТЕ-буфера (pH 8.0) (10 mM трис-HCl; 1 mM ЭДТА).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием праймеров ITS1F (5'-cttggcatttagaggaagtaa-3') [33] и ITS4 (5'-tcctccgcttattgatagc-3') [34]. Протокол реакции амплификации: 10 мин 97°C; 35 циклов: 1 мин 94°C; 1 мин 48°C; 1 мин 72°C; 10 мин 72°C. Для секвенирования применяли технику с использованием флуоресцентно меченных терминирующих реакцию аналогов нуклеотидов по Сэнжеру и соавт. [35]. Каждая последовательность секвенировалась в двух направлениях. В работе использованы флуоресцентно меченные 2',3'-ddNTP набора Big Dye Terminator Kit v.2.0 (“PerkinElmer Life Sciences, Inc.”, США). Секвенирующая ПЦР производилась на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 377 (“Applied Biosystems”, США) на базе научно-производственной фирмы “Хеликс” (Санкт-Петербург). Секвенированные последовательности депонированы в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ DAMBE [36]. Помимо секвенированных нами последовательностей при определении филогенетических взаимоотношений проведено сравнение последовательностей *Avena barbata* (AF494348 [31]), *Alopecurus vaginatus* (AVA96923, AVA96922, AVA96921 и AVA96920 [26]), *Arrhenatherum elatius* (AEL96883 [26]), *Beckmannia eruciformis* (BRH58SITS [37]), *Brachypodium distachyon* (BRH58SITS [38]), *Bromus catharticus* (BCAITS1 и BCAITS2 [25]), *Calamagrostis epigejos* (SEP306448 и SEP306449 [39]), *Deschampsia alpina* (AY237845 [40]), *D. antarctica* (AF521900 [41]), *D. caespitosa* (AF532929 [42]), *D. christophersenii* (AF486267 [43]), *D. flexuosa* (AY237846 [40]), *D. mejlandii* (AF486268 [43]), *D. sukatschewii subsp. borealis* (AY237844 [40]), *Helictotrichon adsurgens* (HAD389119, HAD389117, HAD389115, HAD389113, HAD389111 [37]), *H. pratensis* (HPR389153, HPR389155, HPR389151, HPR389149, HPR96860, HPR96858 [37]), *Holcus lanatus* (HLA96918, HLA96917, HLA96916, HLA96915, HLA96914 [26]), *Koeleria pyramidata* (KPY96913, KPY96912, KPY96911, KPY96910 [26]), *K. digorica*

(KDI96909, KDI96908, KDI96907, KDI96906, KDI96905, KDI96904 [26]), *Lagurus ovatus* (LOV389165 [37]), *Poa trivialis* (AJ240161 [44]), *P. pratensis* (AF171183 [45]), *Pseudarrhenatherum longifolium* (PLO389161, PLO389157 и PLO389159 [37]), *Trisetum turcicum* (Z96900, TTU96901, TTU96903 и TTU96902 [26]), *T. flavescens* (TFL96899, TFL96898, TFL96897, TFL96896 [26]), *T. spicatum subsp. ovatipaniculatum* (TSP389167 [37]), *Zingeria biebersteiniana* (ZBI428836 [46]), *Z. trichopoda* (AJ428835 [46]). Статистическая проверка полученных филогенетических древ проводилась методом бутстрэп-анализа [47, 48]. Вероятная вторичная структура ITS1, ITS2 и 5.8S рРНК рассчитана с использованием разработанной Титовым и соавт. программы GArna [49].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенированные нами последовательности включали фрагмент 18S рДНК, ITS1, 5.8S рДНК, ITS2 и фрагмент 26S рДНК. Последовательности генов 5.8S рРНК у исследованных нами овсов были идентичны и имели длину 163 пн. В их составе налицо консервативные для цветковых растений мотивы, предположительно необходимые для функционирования рибосомы [50, 51], такие как входящие в состав петли А 5.8S рРНК 5-нуклеотидный неспаренный мотив 5'-AAGAA-3' [50], 14-нуклеотидный мотив 5'-GAATTGCAGAATC-3' [51] и терминальный район 5.8S рРНК, формирующий шпильку с 5'-терминальной последовательностью гена 26S рРНК [50–52] (рис. 1). Длины последовательностей ITS1 и ITS2 оказались сходными с таковыми у представителей других триб семейства злаков [23–27, 29–31, 37–44] и составили 219–220 пн для ITS1 и 213–215 пн для ITS2. Вторичная их структура (особенно вторичная структура ITS2) консервативна в значительно большей степени, чем последовательность нуклеотидов (сравним, например: рис. 1 и [52]).

Из сравнения последовательностей ITS1 и ITS2 представителей *Avena* и других родов трибы Aveneae (табл. 2) можно определить последовательность нуклеотидов ITS общего предка *Avena* (представлена на рис. 1). Сравнение ITS-последовательностей у представителей рода *Avena* и других секвенированных Aveneae показало, что замены нуклеотидов и индели (делеции и вставки) встречаются в 118 позициях. Все они представлены в табл. 2.

Сравнение последовательностей ITS1 и ITS2 современных представителей рода *Avena* показывает, что две группы овсов – виды с геномами А (включая полиплоиды) и виды с геномами С (включая *A. macrostachya*) заметно различаются по нуклеотидным последовательностям (табл. 2). Содержание dG + dC в ITS у *A. macrostachya* – 62.5%, у видов с геномом С этот показатель варь-

Таблица 2. Изменчивые позиции нуклеотидов ITS1 и ITS2 представителей триб Aveneae, Phleaeae и Poeae

Триба	Геном	Вид, род	Позиции нуклеотидов
			ITS1
Triticeae		<i>T. aestivum</i>	t c c c t c t - c - c a c c c c c g - t c c c c c a g c c c t a g g a c c g g c a g t a c c c c g t a
Brachypodiae		<i>Brachypodium</i>	t c c c t c - a c - t g c t c c c g - g c c a c c a g c c c a g g a c c g g c g g t t c c c c g t t
Phleaeae		<i>Beckmannia</i>	. t . t - t . . . - c . . c t . t . a . t g a a t a t
		<i>Alopecurus</i>	. . t t - a . . . - c . . c . . t . a . t c t . t a t
Poeae		<i>Colpodium</i>	. . t t t - t . . t . . t . a t a a t
		<i>Poa</i>	. . t t t c . . a . . t . a . a . . g t . . c t . . a - a t
Aveneae	(?)	<i>Z. biebersteiniana</i>	. . t - t . . t t . t . a t - a t
	(?)	<i>Z. trichopoda</i>	. . t . t - t . . t t . t . a t a t t
		<i>Pseudarrhenatherum</i> - c . . . c . . c t g . . c g g c a
		<i>Deschampsia</i>	. t . . - a . . . - c . . c t t . t g t
		<i>Holcus</i> - t g . . . c a . t t t . t g t
		<i>Koeleria</i> - c . . . c . - c . - c g t g . a . . . c t
		<i>Trisetum</i> - c . . . c . - c . - c g g . a . . . c t
		<i>Lagurus</i>	. . t . . - t c . t . t . - c . - - a . . c a g g c t
		<i>Calamagrostis</i> - - c . . Yt t t t g g c t
		<i>Agrostis</i>	. . a . - - c a . t t a t g g c t
		<i>Arrhenatherum</i>	. . a . - t . c . . c t . t g a . . c g t g a a c a
		<i>Avena</i>	t c t t - t t g c a c g c c c c g - g t a c t c a g t c c t a g g g t c g g c g g t g c t c c g c a 1111111111111111111111111111111122
			233444444555566677-78899000011123366677777889999900
			465912568024804823-97835145624903846701347780456928
	?	<i>A. macrostachya</i> - c a g t . t . . c . t . t a . . .
	Cv	<i>A. ventricosa</i> - t g a . . . a t a a . . . t . t t
	Cp	<i>A. clauda</i> - Y t g a . M . . . a a . . . t . t . . c . t . t . K . .
	Cp	<i>A. pilosa</i> - Y t g a . M . . . a a . . . t . t . . c . t . t . K . .
	Ad	<i>A. damascena</i>	. a . y t . . . t . t . . . - . . a . a . . . t . t t t a a t . .
	As	<i>A. atlantica</i>	. a . Yt . . . t . t . . . - . . a . a . . . t . t t t a a t . .
	As	<i>A. hirtula</i>	. a . . t . . . t . t . . M - . . a . a . . . t . K . . t t t a a t . .
	As	<i>A. wiestii</i>	. a . . t . . . t . t . . M - t . a . a . . . t t t t a a t . .
	Al	<i>A. longiglumis</i>	. a a . . t . . . t . t . . - . . a . a . . . t t t t a a t . .
	Ac	<i>A. canariensis</i>	W a . . t . . . t . t . S . - . . a . a . . . t t t . . - . a a . . t . . . t . .
	AB	<i>A. barbata</i>	. . t . . . t . t . . - . . a . a . . . t t t t a a t . .
	ACD	<i>A. sterilis</i>	. a a . . t . . R t . t . S . - . . a . a . . . t t t t a a t . .
	ACD	<i>A. sativa</i>	. a . . t . . R t . t . . - . . a . a . . . Y t t t a a t . .

Таблица 2. Окончание

Триба	Геном	Вид, род	Позиции нуклеотидов
			ITS2
Triticeae		<i>T. aestivum</i>	c a c a t c c a g t c g c c c t c t t g a g t g c t c g t c t a g c a t c c g c g g t - g t t t t g a a g a c c -
Brachypodiace		<i>Brachypodium</i>	c c c t t c t c g g c a a t c t c t c g g g c g c t t g a t t c g c - t g c g g t c c - g c a c a a - a g a t c -
Phleae		<i>Beckmannia</i> t . . . t . g . . c . . . c . . . g t t t t . a c t c t . . - . . a . t
		<i>Alopecurus</i>	. . a . c - t . . . t . g . . c . . . a . . g c . t c . a c a t g - - t - . . a . t
Poeae		<i>Colpodium</i> a c . . . c - t t . . g c . t t . a t . . . t . . . a . t . . . t c t . . - t
		<i>Poa</i> t . . . - g . . c . c . a t . g t . . c . a a . . . g . . . a c . . . t g t - . . . g . t
Aveneae	(?)*	<i>Z. biebersteiniana</i> a c . . . t - t . t . . . t . . g c . t t . a t . a a . t . . . t c t . . - t
	(?)	<i>Z. trichopoda</i> a c . . . c - t t . . g c . t t . a t . a a . t . . . t c t . . - t
		<i>Deschampsia</i> t . . - t t g . . c . . . c a . g t t t c . a t t t g c a . - . . . a c c
		<i>Pseudarrhenatherum</i>	t t . . t c . g . . c . . . t . . a t . . c . a c t g c . . a . t . . t
		<i>Holcus</i> t t . . . t . g . . c . . . t . . t t t t c . a c . . . t t c g . t a . t a t .
		<i>Koeleria</i>	t . . . c . t . . . c . g . t c a t . t c . t c a t c g c - a . . t . .
		<i>Trisetum</i>	t Y . . c - t M . . c . g . t c . . . K . . a t . t c . t c a K c g c K . . . t . t .
		<i>Lagurus</i>	- t . . t c . g . t c a t t t c t c - . c a a . . . c g t . . t - t . .
		<i>Calamagrostis</i>	t t . . t t g . t c a t . t c . a c g . . . a . . a . . t g c . . -
		<i>Agrostis</i>	- t . . . c . g . . c . . . c . . a t . t c a a c g t g c t . - . . t . . c
		<i>Arrhenatherum</i>	t t - . . t a g . t c a t . t t . a c c . . . a g t a c t . a . t . . c
		<i>Avena</i>	t c c c t c t c g a c a t c t c c t g g g g a t c c t a a c t t g c c t c c a a g g c - a t g c g a a a - t t c t
			11111111111111111111-111111111-1112
			111222223334555556667889902223344555555556-66777888-9990
			2679124571235013460572344632674969012356794-69089012-0793
	?	<i>A. macrostachya</i>	. . a a c c a . . a - t . . t
	Cv	<i>A. ventricosa</i>	. . a a c c a . . a - t . . t
	Cp	<i>A. clauda</i>	. . a t a c g - - t a
	Cp	<i>A. pilosa</i>	. . a . c . . . a a t . t . . . R . . - . . . c . . t t . . . - t a
	Ad	<i>A. damascena</i>	. . a . c . . . a a t . t . . . g - c . . t - t a
	As	<i>A. atlantica</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a c a . . . g . . a . a . g . . .
	As	<i>A. hirtula</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a c a . . . g . . a . a . g . . .
	As	<i>A. wiestii</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a Y . c a . . . g . . a . a . t . g . . .
	Al	<i>A. longiglumis</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a c a . . . g . . a . a . t . g . . .
	Ac	<i>A. canariensis</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a c a a . . g . . a . a . t . g . . .
	AB	<i>A. barbata</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a c a . . . g . . a . a . g . . .
	ACD	<i>A. sterilis</i>	. . a . . . t c g t c . . - c
	ACD	<i>A. sativa</i>	. . a . . . t c g t c . . . c . - t . t . a Y . . c a a . . g . . a . a . t . g . . .

Примечание. В таблице использованы символы: М = А и С, R = А и G, W = А и Т, S = С и G, Y = С и Т, K = G и Т.

* Род *Zingeria* традиционно относят к трибе овсовых (Aveneae), однако по особенностям ITS-последовательностей это типичный представитель мятликовых (Poeae).

Таблица 3. Уровень различий между последовательностями ITS1 и ITS2 у видов из рода *Avena* (*p*-расстояние, %)

Вид	<i>A. macrostachya</i>	<i>A. clauda</i>	<i>A. ventricosa</i>	<i>A. pilosa</i>	<i>A. longiglumis</i>	<i>A. wiestii</i>	<i>A. hirtula</i>	<i>A. canariensis</i>	<i>A. atlantica</i>	<i>A. sterilis</i>
<i>A. clauda</i>	4.21									
<i>A. ventricosa</i>	3.28	2.88								
<i>A. pilosa</i>	3.72	0.89	2.19							
<i>A. longiglumis</i>	9.19	10.02	9.67	9.45						
<i>A. wiestii</i>	9.19	9.35	9.01	8.79	1.31					
<i>A. hirtula</i>	8.75	9.58	9.23	9.01	0.87	0.44				
<i>A. canariensis</i>	8.77	9.38	9.25	8.81	0.87	1.09	0.87			
<i>A. atlantica</i>	9.43	9.82	9.47	9.25	1.97	1.31	1.31	1.31		
<i>A. sterilis</i>	9.19	10.02	9.67	9.45	0.65	1.31	0.87	0.87	1.97	
<i>A. sativa</i>	8.75	9.35	9.23	8.79	0.87	1.09	0.87	1.09	1.75	0.65

Примечание. Жирным шрифтом выделены *p*-расстояния между нуклеотидными последовательностями ITS1 и ITS2 видов с геномами С и видов с геномами А.

Используя пакет программ DAMBE, мы рассчитали пропорцию замен в ITS1 и ITS2, по которым различаются исследуемые виды при попарном сравнении (так называемое *p*-расстояние) [48]. Сопоставление ITS *A. macrostachya* с ITS любого из видов овсов с геномами С показывает, что *p*-расстояния между ними находятся в пределах 3.2–4.2%, в то время как *p*-расстояния между *A. macrostachya* и видами с геномами А в 2 раза больше – от 8.75% (*A. hirtula*) до 9.4% (*A. atlantica*) (табл. 3). Топология наиболее вероятного филогенетического дерева, объединяющего исследованные виды из триб Poeae и Aveneae и рассчитанного с использованием метода Fitch и Margoliash [36, 53] и метода максимальной парсимонии [36, 48], представлена на рис. 2.

Наши данные показывают, что все исследованные нами виды рода *Avena*, как с геномами типа А, так и с геномами типа С, представляют собой монофилетическую группу (бутстрэп-индекс = 98). В свою очередь, виды с геномами А (включая полиплоиды) и виды с геномами С формируют отдельные клады в пределах рода *Avena* (бутстрэп = 100). Все 35 наиболее вероятных филогенетических деревьев, построенных методом максимальной парсимонии также показывали монофилетичность рода *Avena* и разделение его на две филогенетические ветви – ветвь видов с геномами А и ветвь видов с геномами С. Эти данные хорошо совпадают с результатами сравнительного анализа RAPD- и AFLP-паттернов диплоидных видов овсов с геномами А и С, где они также формируют две отдельные клады, причем виды с геномами С распо-

лагаются как внешняя группа к *Avena* с геномами АА, ААВВ, ААСС, ААВВСС [54, 55].

Диплоидные виды *Avena* с геномом А имеют низкий уровень межвидовой дивергенции ITS1 + ITS2 (среднее *p*-расстояние = 0.010 при стандартном отклонении, равном 0.0027). В пределах клады видов с геномом А топология представленного на рис. 2 дерева статистически недостоверна (что демонстрируют низкие бутстрэп-индексы), однако в некоторых отношениях привлекательна – так, мы видим кладу из двух морфологически схожих видов *A. hirtula* и *A. wiestii*, часто рассматриваемых систематиками как два подвида *A. barbata* subsp. *wiestii* (Steud.) Mansf. и *A. barbata* subsp. *hirtula* (Lag.) Tab.-Mor. (например, [10]).

Диплоидные виды *Avena* с геномом С по последовательностям ITS можно разделить на две группы: *A. pilosa* и *A. clauda* близки друг к другу, *A. ventricosa* для них внешняя группа. При этом “естественность” клады *pilosa-clauda*, судя по анализу ITS, высоко достоверна (бутстрэп = 99), что согласуется как с данными морфологического анализа [7], так и с кариологическими наблюдениями [11.15, 56], а также с результатами межвидовых скрещиваний [11, 17] и анализа RAPD- и AFLP-паттернов [54, 55].

Среди исследованных видов из других родов наиболее близок к *Avena* по структуре ITS1 и ITS2 *Arrhenatherum elatius* (райграс высокий, французский) (рис. 2). Филогенетические отношения между *Avena* и *Helictotrichon* (овсец) остаются интригующе неясными. Среди множества клонированных и затем секвенированных последовательностей ITS1 представителей рода *Helictotrichon* [26, 37]

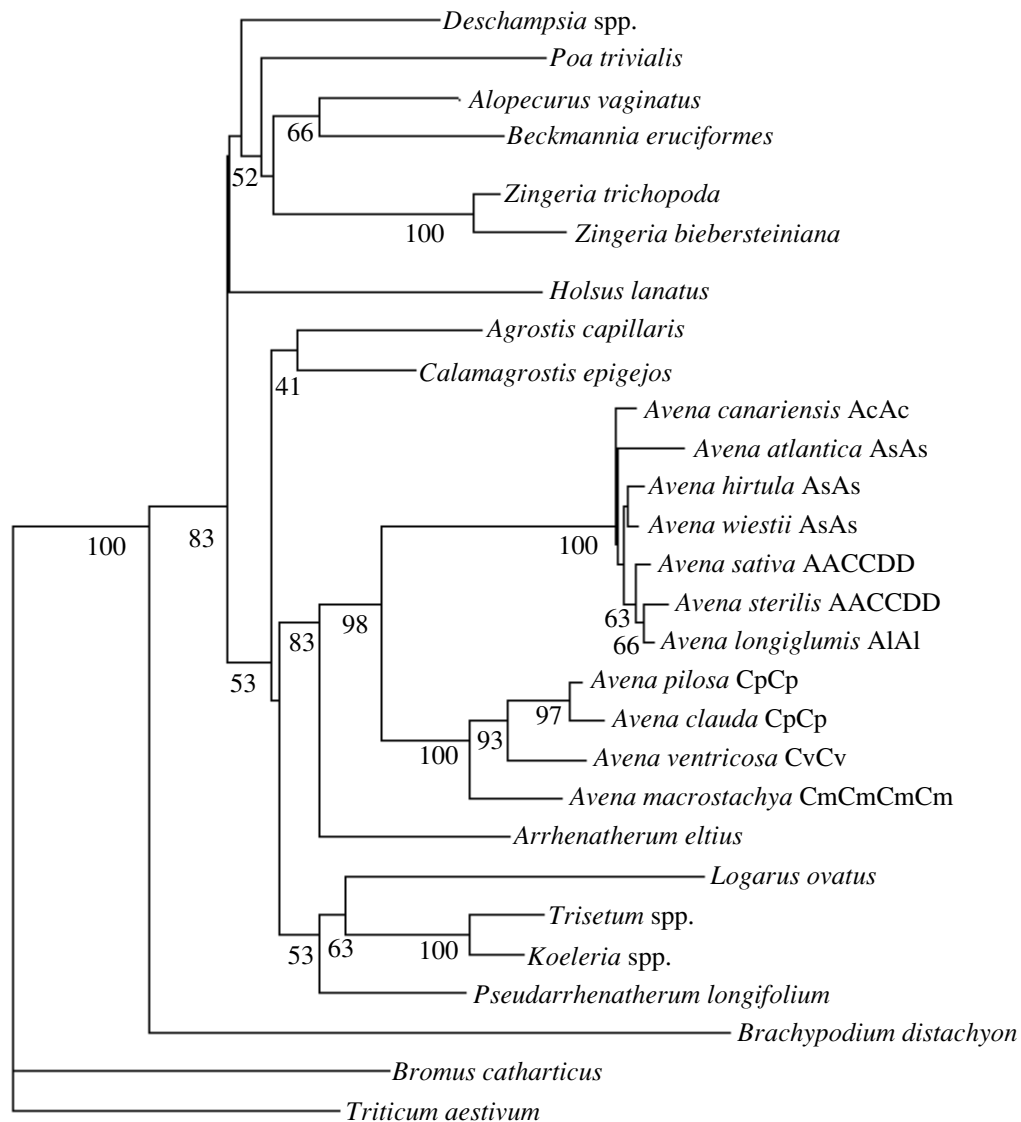


Рис. 2. Филогенетическое древо, отражающее дивергенцию последовательностей ITS1 и ITS2 представителей трибы овсовых (Aveneae) и некоторых мятловых (Poeae). Цифрами обозначены бутстрэп-индексы.

есть последовательность HPR389153, близкая к ITS1 видов *Avena* с геномом А – *p*-расстояние между ними равно 0.0237, в то время как различия между этой последовательностью и последовательностью ITS1 *A. macrostachya* достигают 0.1221. Последовательность HAD389117, напротив, близка к ITS1 видов *Avena* с геномом С (*p*-расстояние между ней и ITS1 видов с геномом С равна 0.0189, отличия же ее от ITS1 видов с геномом А достигают 0.1221). HPR389153 (близкая А-геномам) – это одна из последовательностей, выделенных из геномной ДНК *H. pratense* (L.) Besser ($2n = 84-140$ – см. [13]), HAD389117 – из *H. adsurgens* (Schnur ex Simonk.) Conert ($2n = 120-126$) [13]. Оба вида относятся в высокополиплоидной ($2n = 16-18x$) группе северно-средиземноморских представителей *He-*

lictotrichon [12, 13] – рода, по-видимому, полифилетичного [26], о чем, в частности, свидетельствует то, что другие клонированные последовательности ITS из геномов этих и других видов близки ITS других представителей овсовых, но заметно отличаются от ITS *Avena* [26]. Возможно, появление высокополиплоидных форм *H. pratense* и *H. adsurgens* было связано с межвидовой гибридизацией, в которой принимали участие средиземноморские овсы с геномами А и С.

A. macrostachya имеет в своем геноме гены рРНК, характерные для С-генома, что согласуется с данными GISH-гибридизации, полученными Leggett и Markhand [16]. То, что при этом строение хромосом *A. macrostachya*, особенно выявляемое при С-окрашивании [21, 22], уникально и не

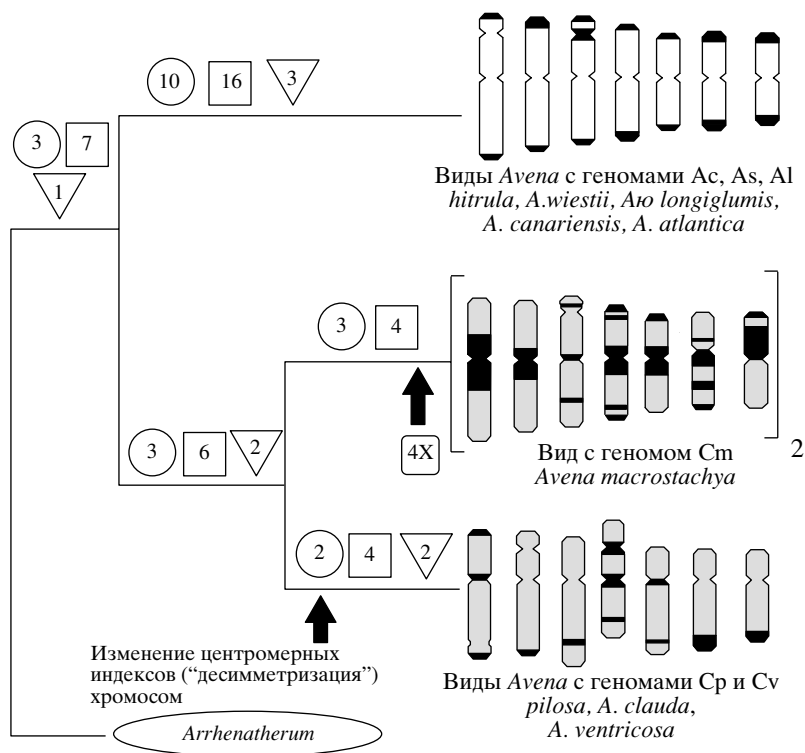


Рис. 3. Эволюция кариотипов на ранних этапах дивергенции *Avena* с геномами А и С. Цифры в кружках – число трансверсий, в квадратах – число транзиций, в треугольниках – число инделей. 4Х – акт тетраплоидизации.

встречается ни у одного из других исследованных представителей рода *Avena*, позволяет выделить этот тип генома как особый С-геном – С_т-геном. Изображенность хромосом С_т-генома сближает кариотип *A. macrostachya* с кариотипами видов *Avena*, имеющими геномы типа А.

Начальные этапы эволюции кариотипов овсов на основании наших данных и данных литературных источников сейчас можно представить так (рис. 3): предок *Avena* имел диплоидный хромосомный набор с “симметричными” хромосомами, похожими в этом отношении на хромосомные наборы (С_т)₄ *A. macrostachya* и кариотипы диплоидных видов овсов с геномом А (см. [11, 15]). Далее произошло разделение филогенетических линий овсов с геномами А и С, сопровождавшееся накоплением различий по рассеянным повторам (см. [57, 58]) (определяющим, по-видимому, результаты GISH-гибридизации – см. [16]) и накоплением специфичных для каждой ветви транзиций и трансверсий. Затем в линии С-геномов произошло разделение филогенетических ветвей предка *A. macrostachya* и предка других видов с геномами С, после чего у предка *A. macrostachya* произошло удвоение хромосомного набора и появились крупные блоки С-гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом [21, 22], а у предка других видов (*A. clauda*, *A. pilosa*, *A. ventricosa*) с геномом С имели место хромосомные перестройки, изме-

нившие положение центромер. Кроме того, “десимметризация” хромосом у предка *A. clauda*, *A. pilosa* и *A. ventricosa* сопровождалась появлением множественных небольших интерстициальных блоков С-гетерохроматина и общим относительно сильным окрашиванием красителем Гимза плеч хромосом ([21, 22, 59]; Бадаева, личное сообщение).

Авторы благодарны Е.Д. Бадаевой за обсуждение результатов работы, А.В. Коняреву и П.П. Стрельченко за поддержку и помощь на ранних этапах данного исследования, А.М. Ефимову и Е.О. Пуниной за внимание и помощь в работе, а также за ценные замечания, сделанные при чтении рукописи этой статьи.

Исследование финансировалось из средств Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 03-04-49477 и 02-04-49667).

Работа поддержана грантами РФФИ № 03-04-49477 и 02-04-49667.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cosson E., Durieu de Malsonneuve M.C.* Notes sur quelques Graminees d'Algerie // Bull. Soc. Bot. Fr. 1855. V. 1. P. 1–318.
2. *Guarino L., Chadja H., Mokedem A.* Collection of *Avena macrostachya* Bal. ex Coss. et Dur. (Poaceae) germ-

- plasm in Algeria // *Economic Botany*. 1991. V. 45. P. 460–466.
3. Baum B.R., Rajhathy T. A study of *Avena macrostachya* // *Can. J. Bot.* 1976. V. 54. P. 2434–2439.
 4. Hoppe H.-D., Pohler W. Successful hybridization between *Avena prostrata* and *Avena macrostachya* // *Cereal Res. Commun.* 1988. V. 16. P. 231–235.
 5. Leggett J.M. A new triploid hybrid between *Avena eriantha* and *A. macrostachya* // *Cereal Res. Commun.* 1990. V. 18. P. 97–101.
 6. Лоскутов И.Г. Видовое разнообразие и селекционный потенциал рода *Avena* L.: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб., 2003. 38 с.
 7. Мальцев А.И. Овсяги и овсы. Л., 1930.
 8. Baum B.R. Delimitation of the genus *Avena* (Gramineae) // *Can. J. Bot.* 1968. V. 46. P. 121–132.
 9. Baum B.R. Classification of the oat species *Avena* (Poaceae) using various taximetric methods and an information-theoretic model // *Can. J. Bot.* 1974. V. 52. P. 2241–2262.
 10. Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976. 788 с.
 11. Родионова Н.А., Солдатов В.Н., Мережко В.Е. и др. Культурная флора. Овес. М.: Колос, 1994. Т. 2. Ч. 3. 368 с.
 12. Röser M. Patterns of diversification in Mediterranean oat grasses (Poaceae: Aveneae) // *Lagascalia*. 1997. V. 19. P. 101–120.
 13. Röser M. Character evolution of the genus *Helictotrichon* (Poaceae: Aveneae) reconsidered in view of recent results in Ibero-Mauritanian and Eurasian species // *Flora*. 1998. V. 193. P. 425–447.
 14. Зоцук Н.В., Бадаева Е.Д., Зеленин А.В. История современного хромосомного анализа. Дифференциальное окрашивание хромосом растений // *Онтогенез*. 2003. Т. 34. № 1. С. 5–18.
 15. Thomas H. Cytogenetics of *Avena* // *Oat Science and Technology* / Eds Marshall H.G., Sorrels M.E. *Agronomy Monograph*. Madison Wis: ASA and CSSA, 1992. № 33. P. 473–508.
 16. Leggett J. M., Markhand G.S. The genomic structure of *Avena* revealed by GISH / Eds Brandham P.E., Bennett M.D. // *Kew Chromosome Conf. IV*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. P. 133–139.
 17. Лоскутов И.Г. Межвидовые скрещивания в роде *Avena* L. // *Генетика*. 2001. Т. 37. № 5. С. 581–590. (*Loskutov I.G.* Interspecific crosses in the genus *Avena* L. // *Rus. J. Genetics*. 2001. V. 37. № 5. P. 467–475.)
 18. Ladizinsky G. Genetic control of bivalent pairing in the *Avena strigosa* polyploid complex // *Chromosoma*. 1973. V. 42. P. 105–110.
 19. Katsiotis A., Hagidimitriou M., Heslop-Harrison J.S. The close relationship between the A and B genomes in *Avena* L. (Poaceae) determined by molecular cytogenetic analysis of total genomic, tandemly and dispersed repetitive DNA sequences // *Ann. Botany*. 1997. V. 79. P. 103–109.
 20. Linares C., Ferrer E., Fominaya A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid *Avena sativa* L. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 12450–12455.
 21. Jellen E.N. C-banding of *Avena macrostachya* // <http://pas.byu.edu/Faculty/enj/oatsite/aventaxa.htm>.
 22. Hutchinson J., Postoyko J. C-banding of *Avena* species // *Genetic Manipulation in Plant Breeding: Proc. Int. Symp., EUCARPIA*. Berlin, 1986. P. 157–160.
 23. Hsiao C., Chatterton N.J., Asay K., Jensen K.B. Phylogenetics relationships of 10 grass species: An assesment of philogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots // *Genome*. 1994. V. 37. P. 112–120.
 24. Hsiao C., Chatterton N.J., Asay K., Jensen K.B. Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 389–398.
 25. Ainouche M.L., Bayer R.J. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA // *Genome*. 1997. V. 40. P. 730–743.
 26. Grebenstein B., Roser M., Sauer W., Hemleben V. Molecular phylogenetic relationships in Aveneae (Poaceae) species and other grasses as inferred from ITS1 and ITS2 rDNA sequences // *Plant Syst. Evol.* 1998. V. 213. P. 233–250.
 27. Wang J.-B., Wang C., Shi S.-H., Zhong Z. Evolution of paternal ITS regions of nuclear rDNA in allopolyploid *Aegilops* (Poaceae) species // *Hereditas*. 2000. V. 133. P. 1–7.
 28. Troitsky A.V., Melekhovets Yu.F., Rakhimova G.M. et al. Angiosperm origin and early stages of seed plant evolution deduced from rRNA sequence comparisons // *J. Mol. Evol.* 1991. V. 32. P. 253–261.
 29. Hershkovitz M.A., Lewis L.A. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region // *Mol. Biol. Evol.* 1996. V. 13. P. 1276–1295.
 30. Chatterton N.J., Hsiao C., Asay K.H. et al. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of rDNA in the primitive oat species, *Avena longiglumis* Durieu // *Plant Mol. Biol.* 1992. V. 20. P. 163–164.
 31. Moore L.A., Field C.B. См.: www.ncbi.nlm.nih.gov.
 32. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* 1987. V. 19. P. 11–15.
 33. Gardes M., Brunes T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts // *Mol. Ecol.* 1993. V. 2. P. 130–138.
 34. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* / Eds Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. San Diego: Acad. Press, 1990. P. 315–322.
 35. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
 36. Xia X., Xie Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution // *J. Heredity*. 2001. V. 92. P. 371–373.
 37. Hemleben V., Grebenstein B., Herges H. См.: www.ncbi.nlm.nih.gov.
 38. Hsiao C., Chatterton N.J. Ibid.

39. Jakob S.S., Blattner F.R. Ibid.
40. Brysting A.K., Fay M.F., Leitch I.J., Aiken S.G. Ibid.
41. Corach D., Fernandez Souto D., Bernasconi P. Ibid.
42. Catalan P., Torrecilla P., Rodriguez J.-A., Olmstead R. Ibid.
43. Chiapella J.O. Ibid.
44. Charmet G., Ravel C., Balfourier F. Phylogenetic analysis in the Festuca-Lolium complex using molecular markers and ITS rDNA sequences // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 94. P. 1038–1046.
45. Gaut B.S., Tredway L.P., Kubik C. et al. См.: www.ncbi.nlm.nih.gov.
46. Kotseruba V., Gernand D., Meister A., Houben A. Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingeria trichopoda* (2n = 8) // Genome. 2003. V. 46. P. 156–163.
47. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
48. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000.
49. Titov I.I., Vorobiev D.G., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A. GArna: Predicting 2D structure of RNA by genetic algorithm // [http://www.icg.sbras.ru / rus / ResourcesRus.html](http://www.icg.sbras.ru/rus/ResourcesRus.html).
50. Suh Y., Thien L.B., Zimmer E.A. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene in *Canella winterana* (Magnoliales; Canellaceae) // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 6101–6102.
51. Jobs D.V., Thien L.B. Conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences // Plant Mol. Biology Reporter. 1997. V. 15. P. 326–334.
52. Goertzen L.R., Cannone J.J., Gutell R.R., Jansen R.K. ITS secondary structure derived from comparative analysis: Implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae // Mol. Phylogenetics and Evolution. 2003. V. 29. P. 216–234.
53. Fitch W.M., Margoliash E. Construction of phylogenetic trees // Science. 1967. V. 155. P. 279–284.
54. Перчук И.Н., Лоскутов И.Г., Окуно К. Изучение видового разнообразия овса с использованием RAPD-анализа // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 41–44.
55. Drossou A., Katsiotis A., Leggett J.M. et al. Genome and species relationships in genus *Avena* based on RAPD and AFLP molecular markers // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 48–54.
56. Rajhathy T., Thomas H. Chromosomal differentiation and speciation in diploid *Avena*. III. Mediterranean wild populations // Canad. J. Genet. Cytol. 1967. V. 9. P. 52–68.
57. Linares C., Serna A., Fominaya A. Chromosomal organization of a sequence related to LTR-like elements of Ty1-copia retrotransposons in *Avena* species // Genome. 1999. V. 42. P. 706–713.
58. Linares C., Irigoyen M.I., Fominaya A. Identification of C-genome chromosomes involved in intergenomic translocations in *Avena sativa* L., using cloned repetitive DNA sequences // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 353–360.
59. Jellen E.N., Phillips R.L., Rines H.W. C-banded karyotypes and polymorphisms in hexaploid oat accessions (*Avena* spp.) using Wright's stain // Genome. 1993. V. 36. P. 1129–1137.